

⑤

Int. Cl. 2:

C 12 D 13/10

⑬ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

C 07 G 7/02

G 01 N 31/14

DEUTSCHES



PATENTAMT

DE 28 17 087 A 1

⑪

Offenlegungsschrift **28 17 087**

⑫

Aktenzeichen:

P 28 17 087.8

⑬

Anmeldetag:

19. 4. 78

⑭

Offenlegungstag:

2. 11. 78

⑮

Unionspriorität:

⑮ ⑬ ⑪

19. 4. 77 Japan 44146-77

⑯

Bezeichnung:

Glycerinoxidase, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur quantitativen Glycerinbestimmung

⑰

Anmelder:

Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokio

⑱

Vertreter:

Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr. rer.nat.; Vossius, D., Dipl.-Chem.;
Hiltl, E., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Pat.-Anwälte, 8000 München

⑲

Erfinder:

Terada, Osamu; Uwajima, Takayuki; Mihara, Akira; Aisaka, Kazuo;
Machida, Tokio; Akita, Hiroko, Yokohama, Kanagawa; Nagai, Toshiaki;
Shimizu, Yoshiaki; Shizuoka (Japan)

BEST AVAILABLE COPY

DE 28 17 087 A 1

VOSSIUS · VOSSIUS · HILTI · TAUCHNER · HEUNEMANN
PATENTANWÄLTE

2817087

SIEBERTSTRASSE 4 · 8000 MÜNCHEN 85 · PHONE: (089) 47 4078
CABLE: BENZOLPATENT MÜNCHEN · TELEX 5-29 453 VOPAT D

5 u.Z.: M 697

19. April 1978

Case: 213-4

KIOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

Tokyo, Japan

10

"Glycerinoxidase, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre
Verwendung zur quantitativen Glycerinbestimmung"

15

Priorität: 19. April 1977, Japan, Nr. 44146/1977

20

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Glycerinoxidase

25

2. Glycerin oxidierendes Enzym, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, dass es Glycerin in Gegenwart von Sauer-
stoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Glycerin-
aldehyd oxidiert.

30

3. Enzym nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, dass es durch Züchtung eines Mikro-
organismus der Gattungen Aspergillus oder Neurospora
hergestellt worden ist.

35

L

809844/0808

ORIGINAL INSPERINT

2817087

- 1 4. Enzym nach Anspruch 3, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, dass als Mikroorganismus *Aspergillus*
japonicus KY-45 (FERM-P Nr. 3959, NRRL 11102), *Asper-*
gillus oryzae KY-63 (NRRL 11103), *Aspergillus parasiticus*
5 KY-77 (NRRL 11104), *Aspergillus flavus* KY-98 (NRRL 11105),
Neurospora crassa KY-462 (FERM-P Nr. 3960, NRRL 11106),
Neurospora sitophila KY-445 (NRRL 11264) oder *Neurospora*
tetrasperma KY-447 (NRRL 11265) verwendet worden ist.
- 10 5. Enzym nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, dass es ein Molekulargewicht von
mindestens 300 000 aufweist.
- 15 6. Enzym nach Anspruch 2, g e k e n n z e i c h n e t durch
ein Molekulargewicht von mindestens 300 000, ein Tempera-
turoptimum von etwa 30 bis 50°C, Stabilität in wässrigen
Medien im pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 und Inaktivität in
wässrigen Medien nach 30-minütiger Behandlung bei Tempera-
turen von 50 bis 60°C.
- 20 7. Verfahren zur Herstellung von Glycerinoxidase gemäss
Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man einen Mikroorganismus der Gattungen *Aspergillus*
oder *Neurospora*, der zur Bildung dieses Enzyms fähig ist,
25 in einem Nährmedium züchtet und das Enzym aus der Kultur-
brühe isoliert.
- 30 8. Verfahren nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, dass das Nährmedium 0,1 bis 5 g/dl
Glycerin enthält.
- 35 9. Verfahren nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, dass das Nährmedium zu Beginn der Züchtung
einen pH-Wert von 6 bis 8 aufweist und die Züchtung unter
Rühren 30 bis 72 Stunden bei Temperaturen von 20 bis 40°C
durchgeführt wird.

809844/0808

2817087

- 1 10. Verfahren nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, dass man als Mikroorganismus *Aspergillus*
japonicus KY-45 (FERM-P Nr. 3959, NRRL 11102), *Asper-*
gillus oryzae KY-63 (NRRL 11103), *Aspergillus parasiticus*
5 KY-77 (NRRL 11104), *Aspergillus flavus* KY-98 (NRRL 11105),
Neurospora crassa KY-462 (FERM-P Nr. 3960, NRRL 11106),
Neurospora sitophila KY-445 (NRRL 11264) oder *Neurospora*
tetrasperma KY-447 (NRRL 11265) verwendet.
- 10 11. Verwendung von Glycerinoxidase nach Anspruch 2 zur
quantitativen Bestimmung von Glycerin in Lösung,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man das
Glycerin in Gegenwart von Sauerstoff mit Glycerinoxidase
umsetzt und die verbrauchte Sauerstoffmenge oder die
15 Menge an im wässrigen Medium durch die Einwirkung der
Glycerinoxidase gebildetem Wasserstoffperoxid oder
Glycerinaldehyd misst, wobei die jeweiligen Mengen ein
Mass für die Glycerinkonzentration in der Lösung sind.
- 20 12. Ausführungsform nach Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man das gebildete
Wasserstoffperoxid quantitativ bestimmt, indem man es
in Gegenwart von Peroxidase mit 4-Aminoantipyrin und
Phenol unter Bildung eines Chinoniminpigments, das
25 quantitativ durch Messen der optischen Dichte der
Reaktionslösung bei 500 nm bestimmt wird, umsetzt.
13. Ausführungsform nach Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass der gebildete Gly-
30 cerinaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt
wird und das gebildete 2,4-Dinitrophenylhydrazon colori-
metrisch quantitativ bestimmt wird.
14. Ausführungsform nach Anspruch 11, d a d u r c h
35 g e k e n n z e i c h n e t, dass die verbrauchte Sauer-
stoffmenge mittels einer Sauerstoffelektrode und einem
Warburg-Manometer bestimmt wird.

809844/0808

2817087

5 u.Z.: M 697
Case: 213-4
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
Tokyo, Japan

10

15 "Glycerinoxidase, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre
Verwendung zur quantitativen Glycerinbestimmung"

20 Die Erfindung betrifft den in den Ansprüchen gekennzeichneten
Gegenstand.

Das erfindungsgemässe Glycerin oxidierende Enzym wird als
"Glycerinoxidase" bezeichnet. Aufgrund zahlreicher enzyma-
25 tischer Untersuchungen unter Verwendung von verschiedenen
Mikroorganismen der Gattungen Aspergillus und Neurospora
wurde erfindungsgemäss festgestellt, dass in der Kulturbrühe
von Mikroorganismen, wie Aspergillus japonicus KY-45 und
Neurospora crassa KY-462, ein Enzym zu finden ist, das
30 selektiv Glycerin oxidiert.

Obgleich für ein derartiges Enzym bisher ein Bedürfnis
bestanden hat, stand es bisher nicht zur Verfügung.

35

809844/0808

1 Das erfindungsgemässe Enzym weist folgende enzymologischen
und physiko-chemischen Eigenschaften auf:

(1) Wirkung

5 Die erfindungsgemässe Glycerinoxidase oxidiert Glycerin
unter Verbrauch von Sauerstoff und unter Bildung von
Wasserstoffperoxid und Glycerinaldehyd.

(2) Substratspezifität

10 Das erfindungsgemässe Enzym reagiert spezifisch mit
Glycerin.

(3) pH-Optimum und stabiler pH-Bereich

(3.1) pH-Optimum

15 Durch Mikroorganismen der Gattung
Aspergillus gebildete Glycerinoxidase
(nachstehend als "Enzym der Gattung
Aspergillus" bezeichnet) pH-Wert 7 bis 8

20 Glycerinoxidase, gebildet durch
Mikroorganismen der Gattung
Neurospora (nachstehend als "Enzym
der Gattung Neurospora" bezeichnet) pH-Bereich 8,0
bis 8,5

25

(3.2) Stabiler pH-Bereich

Enzym der Gattung Aspergillus pH-Bereich 5,0
bis 8,0

30

Enzym der Gattung Neurospora pH-Wert 5,0
bis 8,0

(4) Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität

35 Die Enzymaktivität wird in Einheiten angegeben. Unter
"1 Einheit" ist die Enzymaktivität zu verstehen, die
1 μ Mol Glycerin bei 37°C in Gegenwart von Sauerstoff

2817087

innerhalb 1 Minute zersetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivität wird folgendermassen durchgeführt:

Glycerin wird unter Rühren mit Glycerinoxidase umgesetzt, wobei Wasserstoffperoxid gebildet wird. Das erhaltene Wasserstoffperoxid wird in Gegenwart von Peroxidase mit 4-Aminoantipyrin und Phenol umgesetzt, wobei ein Chinoniminpigment entsteht. Die optische Dichte des erhaltenen Chinoniminpigments bei 500 nm wird zur Bestimmung der Menge an gebildetem Wasserstoffperoxid gemessen. Dadurch wird die Enzymaktivität bestimmt (dieses Verfahren wird nachstehend als "4-AA-Verfahren" bezeichnet).

Die spezifische Aktivität ist definiert durch die Anzahl der Enzymeinheiten pro 1 mg Protein. Die Menge des Enzymproteins wird gemäss dem Lowry-Verfahren unter Verwendung eines Kupfer-Folin-Reagens bestimmt; vgl. O.H. Lowry, T.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall, J. Biol. Chem., Bd. 193 (1951), S. 265.

(5) Temperaturoptimum der enzymatischen Wirkung

Enzym der Gattung Aspergillus	etwa 40°C
Enzym der Gattung Neurospora	40 bis 45°C

(6) Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Enzymaktivierung

(6.1) Temperatur

Das Enzym der Gattung Aspergillus wird durch 30-minütige Behandlung bei 45°C zu etwa 60 Prozent und durch 30-minütige Behandlung bei 60°C im wesentlichen vollständig inaktiviert.

Das Enzym der Gattung Neurospora wird durch 30-minütige Behandlung bei 25°C zu etwa 50 Prozent und durch 30-minütige Behandlung bei 50°C im wesentlichen vollständig inaktiviert.

809844/0808

ORIGINAL PREPARED

2817087

(6.2) pH-Wert

Das Enzym der Gattung Aspergillus wird durch 30-minütige Behandlung bei einem pH-Wert oberhalb von 10 oder unterhalb von 4 inaktiviert.

Das Enzym der Gattung Neurospora wird ebenfalls bei den vorgenannten pH-Werten inaktiviert.

(7) Hemmung, Aktivierung und Stabilisierung

(7.1) Hemmung

Die Hemmung des Enzyms ohne Zusatz von Inhibitor wird als 100 gesetzt. In Tabelle I sind die enzymatischen Aktivitäten in Gegenwart von verschiedenen Inhibitoren in einer Konzentration von 1 millimolar angegeben. Die Aktivitäten werden gemäss dem 4-AA-Verfahren gemessen, wobei mit Hilfe des entstandenen H_2O_2 ein 4-Aminoantipyrin-Pigmentsystem gebildet wird.

Tabelle I

Inhibitor	Enzym	
	Enzym der Gattung Aspergillus	Enzym der Gattung Neurospora
ohne	100	100
$AgNO_3$	30	-
$HgCl_2$	20	23
$Pb(CH_3COO)_2$	15	-
$CuSO_4$	10	20
$ZnSO_4$	-	23
$FeSO_4$	-	0
NaN_3	20	-
O-Phenanthrolin	90	-

809844/0808

2817087

1	α, α' -Dipyridyl	85	-
	PCMB (p-Chlormercuribenzoat)	50	108
	N-Ethylmaleimid	100	-
	NH ₂ OH-HCl	0	0
5	8-Hydroxychinolin	90	-
	Diethyldithiocarbamat	35	20
	Neocuproin	100	-
	Jodacetat	-	100
	Cystein	-	60
10	Dithiothreit	100	-
	EDTA	105	80

(7.2) Aktivierung

15 Es ist keine speziell zur Aktivierung geeignete Verbindung bekannt.

(7.3) Stabilisierung

20 Das Enzym der Gattung Aspergillus lässt sich durch Zusatz von 0,1 bis 1,0 millimolar einer Sulfhydryl-Verbindung, wie Mercaptoethanol und Dithiothreit, stabilisieren.

(8) Reinigungsverfahren

25 Die Reinigung kann gemäss folgenden üblichen Verfahren durchgeführt werden:

- (1) Fraktionierende Fällung mit Ammoniumsulfat;
- (2) Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose;
- 30 (3) Molekularsiebfraktionierung unter Verwendung von dreidimensional vernetztem Dextran (Sephadex);
- (4) Säulenchromatographie an Hydroxyapatit;
- (5) Gefriertrocknung der aktiven Fraktionen.

Diese Verfahren sind nachstehend näher erläutert.

(9) Molekulargewicht

809844/0808

1 Das Molekulargewicht des erfindungsgemässen Enzyms wird
durch Gelchromatographie an einer mit dreidimensional
vernetztem Dextran (Sephadex G-200) gepackten Säule
bestimmt. Es ergibt sich für das Enzym der Gattung
5 Aspergillus ein Molekulargewicht von mindestens 300 000.

(10) Kristallstruktur und Elementaranalyse

Eine Kristallisation des Enzyms konnte bisher nicht
erreicht werden. Eine Elementaranalyse wurde nicht
10 durchgeführt.

Aus den vorstehenden Eigenschaften ergibt sich, dass es sich
beim erfindungsgemässen Enzym um das neue Enzym Glycerin-
oxidase handelt.

15

Die erfindungsgemässe Glycerinoxidase lässt sich durch Züchtung
von Mikroorganismen, die zur Bildung von Glycerinoxidase fähig
sind und zu den Gattungen Aspergillus oder Neurospora ge-
hören, in einem Nährmedium, das entsprechende Kohlenstoff-
20 und Stickstoffquellen, anorganische Bestandteile und andere
Nährstoffe enthält, erhalten. Die Glycerinoxidase wird
sodann aus der entstandenen Kulturbrühe gewonnen.

Es können beliebige Mikroorganismen verwendet werden, die
25 zu den Gattungen Aspergillus oder Neurospora gehören und
die die Fähigkeit zur Bildung von Glycerinoxidase aufweisen.
Nachstehend sind besonders bevorzugte Mikroorganismenstämme
aufgeführt:

Aspergillus japonicus KY-45 (FERM-P Nr. 3959, NRRL 11102),
30 Aspergillus oryzae KY-63 (NRRL 11103),
Aspergillus parasiticus KY-77 (NRRL 11104),
Aspergillus flavus KY-98 (NRRL 11105),
Neurospora crassa KY-462 (FERM-P Nr. 3960, NRRL 11106),
Neurospora sitophila KY-445 (NRRL 11264) und
35 Neurospora tetrasperma KY-447 (NRRL 11265).

- 1 Die mikrobiologischen Eigenschaften dieser Mikroorganismen sind in den nachstehend aufgeführten Literaturstellen beschrieben:
- 5 *Aspergillus japonicus*: The genus *Aspergillus*: The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1965, S. 327-328
- Aspergillus oryzae*: a.a.O. S. 370-373
- 10 *Aspergillus parasiticus*: a.a.O. S. 369-371
- Aspergillus flavus*: a.a.O. S. 361-365
- Neurospora crassa*: Comparative Morphology of Fungi, McGraw-Hill Book Company, Inc.,
15 New York und London 1928, S. 227;
Jour. Agr. Res., Bd. 34 (1927),
S. 1019-1042
- Neurospora sitophila*: a.a.O. S. 226-227
- 20 *Neurospora tetrasperma*: a.a.O. S. 227
- Im erfindungsgemässen Verfahren können beliebige synthetische und natürliche Medien verwendet werden, die die entsprechenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganischen
25 Bestandteile und anderen Nährstoffe enthalten.
- Beispiele für Kohlenstoffquellen sind Kohlenhydrate, wie Glucose und Melassen, und Zuckeralkohole, wie Glycerin,
30 Sorbit und Mannit.
- Beispiele für Stickstoffquellen sind Ammoniak, verschiedene anorganische und organische Ammoniumverbindungen, wie Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumphosphat und Ammoniumacetat, Stickstoffverbindungen, wie
35 Harnstoff, und stickstoffhaltige organische Materialien,

- 1 wie Pepton, Hefeextrakt, Caseinhydrolysat, entfettete
Sojabohnen und Hydrolyseprodukte davon.

Als anorganische Bestandteile können Salze von Metallen,
5 wie Natrium, Kalium, Mangan, Magnesium, Calcium, Kobalt,
Nickel, Zink und Kupfer, sowie Salze der Chromsäure,
Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salpetersäure und Salzsäure
verwendet werden.

- 10 Im erfindungsgemässen Verfahren lässt sich Glycerinoxidase
in besonders hohen Ausbeuten herstellen, wenn ein Glycerin-
oxidase bildender Mikroorganismus in einem Medium mit einem
Gehalt an Glycerin gezüchtet wird. Beispielsweise ist die
Produktivität an Glycerinoxidase, ausgedrückt als enzymati-
15 sche Aktivität, bei Züchtung in einem Medium mit einem
Gehalt an Glycerin, 10- bis 100-fach höher als bei Züchtung
des Mikroorganismus in einem Medium mit einem Gehalt an
1 g/dl Glucose, 1 g/dl Malzextrakt und 0,5 g/dl Hefeextrakt
oder in Czapeck-Medium. Vorzugsweise wird Glycerin in Mengen
20 von 0,1 bis 5 g/dl dem Medium zugesetzt.

Die Züchtung wird im allgemeinen bei Temperaturen von 20 bis
40°C und vorzugsweise bei 25 bis 35°C und bei pH-Werten von
6 bis 8, vorzugsweise bei etwa 7, durchgeführt. Eine be-
25 trächtliche Menge an Glycerinoxidase bildet sich in der er-
haltenen Kulturbrühe, wenn die Züchtung unter Schütteln
oder unter Belüftung und Bewegung im Submersverfahren 30
bis 72 Stunden unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt
wird.

- 30 Die in der Kulturbrühe angereicherte Glycerinoxidase lässt
sich auf folgende Weise gewinnen:
Glycerinoxidase wird im allgemeinen in den Mikroorganismen-
zellen gebildet. Zur Gewinnung des Enzyms aus den Zellen
35 werden die durch Filtration oder Zentrifugation der Kultur-

2817087

1 brühe nach Beendigung der Züchtung erhaltenen Mikroorganismen-
zellen ausreichend mit Wasser oder Pufferlösung gewaschen.
Anschliessend werden die Mikroorganismenzellen in einer
entsprechenden Menge an Puffer suspendiert und aufgebrochen.
5 Das Aufbrechen der Zellen wird durch mechanische Zerkleinerung
vorgenommen, beispielsweise unter Verwendung folgender
Vorrichtungen:
Mörser, Dyno-Mühle (Produkt der Firma Willy A. Bachofen,
Schweiz), Manton-Goulin, French-Press, Fuse-Press und Ultra-
10 schall-Zerkleinerungsgerät.

Feste Materialien werden aus der erhaltenen Lösung der aufge-
brochenen Mikroorganismenzellen durch Filtration oder Zentri-
fugation entfernt. Anschliessend wird die Glycerinoxidase
15 aus der Lösung gemäss üblichen Verfahren zur Isolation von
Enzymen gewonnen. Beispielsweise lassen sich Enzympulver
durch (1) fraktionierende Fällung mit Ammoniumsulfat,
(2) Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose, (3) Molekular-
siebfractionierung an dreidimensional vernetztem Dextran
20 (Sephadex), (4) Säulenchromatographie an Hydroxyapatit und
(5) Gefriertrocknen der aktiven Fraktionen erhalten. Selbst-
verständlich können die einzelnen Verfahrensstufen wiederholt
werden. Gegebenenfalls können zusätzlich auch andere übliche
Reinigungsverfahren angewendet werden.
25

Fig. 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Sauerstoffaufnahme
in einem Reaktionssystem bei Umsetzung von Glycerinoxidase
mit Glycerin in Gegenwart von Sauerstoff. Die Kurve A zeigt
30 die Sauerstoffaufnahme in einem Katalase-freien Reaktions-
system, während die Kurve B die Sauerstoffaufnahme in Gegen-
wart von Katalase wiedergibt.

Fig. 2 zeigt die relativen Aktivitäten des Enzyms der
Gattung Aspergillus nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C
35 und verschiedenen pH-Werten.

809844/0808

- 1 Fig. 3 zeigt die Restaktivitäten des Enzyms der Gattung
Aspergillus nach 30-minütiger Behandlung bei 30°C und ver-
schiedenen pH-Werten.
- 5 Fig. 4 zeigt die relativen Aktivitäten des Enzyms der Gattung
Neurospora nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C und ver-
schiedenen pH-Werten.
- Fig. 5 zeigt die Restaktivitäten des Enzyms der Gattung
10 Neurospora nach 30-minütiger Behandlung bei 30°C und ver-
schiedenen pH-Werten.
- Fig. 6 zeigt die Beziehung zwischen Reaktionszeit und der
optischen Dichte bei 500 nm (Mass für die Aktivität des
15 Enzyms).
- Fig. 7 zeigt die Aktivitäten des Enzyms der Gattung
Aspergillus nach 10-minütiger Inkubation bei pH-Wert 8 und
verschiedenen Temperaturen.
- 20 Fig. 8 zeigt die Aktivitäten des Enzyms der Gattung Neuros-
pora nach 10-minütiger Inkubation bei pH-Wert 8 und ver-
schiedenen Temperaturen.
- 25 Fig. 9 zeigt die Restaktivitäten des Enzyms der Gattung
Aspergillus nach 30-minütiger Behandlung bei pH-Wert 7 und
verschiedenen Temperaturen in 0,1 m Ammoniumpuffer.
- Fig. 10 zeigt die Restaktivitäten des Enzyms der Gattung
30 Neurospora nach 30-minütiger Behandlung bei pH-Wert 7 und
verschiedenen Temperaturen in 0,1 m Ammoniumpuffer.
- Fig. 11 zeigt die Beziehung zwischen Substratkonzentration
(Glycerin) und optischer Dichte der Reaktionslösungen bei
35 500 nm (vgl. Tabelle IV).

2817087

Die enzymologischen und physiko-chemischen Eigenschaften der auf diese Weise erhaltenen Glycerinoxidase sind nachstehend angegeben. Dabei werden als Glycerinoxidase-Präparate die Produkte der Beispiele 1 und 2 verwendet.

1. Wirkung

Das Enzym oxidiert unter Verbrauch von Sauerstoff und unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Glycerinaldehyd spezifisch Glycerin.

(a) Bestätigung der Bildung von Wasserstoffperoxid

(a)-1. Glycerinoxidase wird in Gegenwart von Sauerstoff mit Glycerin umgesetzt. Anschliessend wird das Enzymsystem mit Peroxidase, Phenol und 4-Aminoantipyrin versetzt, wodurch sich Chinoniminpigment in Reaktionssystem bildet; bezüglich der Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit Peroxidase, Phenol und 4-Aminoantipyrin vgl. Clin. Chem., Bd. 20 (1974), S. 470.

(a)-2. Glycerinoxidase wird in Gegenwart von Sauerstoff und unter Bildung von Wasserstoffperoxid mit Glycerin umgesetzt. Zur Zersetzung des Wasserstoffperoxids wird Katalase zugesetzt. Anschliessend wird das Reaktionssystem mit Peroxidase, Phenol und 4-Aminoantipyrin versetzt, um die gleiche Reaktion, wie vorstehend erläutert, durchzuführen. Im Reaktionssystem wird aber nicht das gleiche Chinoniminpigment gebildet.

(a)-3. Bei Anwesenheit von Katalase im durch Glycerinoxidase in Gegenwart von Sauerstoff katalysierten Glycerin-Oxidationssystem sinkt die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs auf die Hälfte. Diese Tatsache wird durch folgende experimentellen Befunde gestützt:

809844/0808

2817087

1 (a)-3-1. Reaktionssystem A (ohne Katalase):

Reagentien

5	wässrige 0,01 m Glycerinlösung	0,5 ml
	0,1 m $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ -Puffer (nachstehend als "Ammoniumpuffer" bezeichnet) (pH-Wert 8,0)	1,0 ml
	wässrige Glycerinoxidaselösung	0,2 ml *1
	wässrige 2,4-millimolare 4-Amino-antipyrinlösung	0,5 ml
10	wässrige 42-millimolare Phenollösung	0,5 ml
	wässrige Peroxidaselösung	0,2 ml *2
	Wasser	0,1 ml

- 15 *1: 5 μ Mol Glycerinoxidase mit einer spezifischen Aktivität von 30, erhalten gemäss Beispiel 1;
 *2: Produkt der Sigma Corp., V.St.A., mit einem Gehalt an 200 Einheiten, spezifische Aktivität 1000.

20 (a)-3-2. Reaktionssystem B (mit Katalase):

Reagentien

	wässrige 0,01 m Glycerinlösung	0,5 ml
	0,1 m Ammoniumpuffer (pH-Wert 8,0)	1,0 ml
25	wässrige Glycerinoxidaselösung	0,2 ml *1
	wässrige Katalaselösung	1,0 ml *3
	Wasser	0,3 ml

- 30 *1: vgl. Reaktionssystem A;
 *3: Sigma Corp., V.St.A., mit einem Gehalt an 100 Katalaseeinheiten, spezifische Aktivität 100.

(a)-3-3. Durchführung der Reaktion

35

809844/0808

2817087

1 Im Fall des Reaktionssystems ohne Katalase werden die
Bestandteile gemäss Reaktionssystem A vermischt. Die
Umsetzung wird unter Rühren bei 37°C durchgeführt.
5 Die Menge der Sauerstoffaufnahme wird mit einem Warburg-
Manometer gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 1
zusammengestellt.

10 Im Fall des Systems mit einem Gehalt an Katalase werden
die Bestandteile des Reaktionssystems B vermischt. Die
Umsetzung wird bei 37°C durchgeführt. In ähnlicher Weise
wird die Sauerstoffaufnahme gemessen. Die Ergebnisse
sind in Fig. 1 zusammengestellt. Aus Fig. 1 ergibt sich,
dass der Sauerstoffverbrauch in Abwesenheit von Katalase
15 4,95 μ Mol (Kurve A in Fig. 1) für 5,5 μ Mol Glycerin
als Substrat beträgt.

20 In Anwesenheit von Katalase (Kurve B in Fig. 1) werden
2,49 μ Mol Sauerstoff verbraucht, was etwa der halben
Menge von (A) entspricht.

25 Aus den vorstehenden Abschnitten (a)-1, (a)-2 und (a)-3
ergibt sich, dass das erfindungsgemässe Enzym zur Bildung
von Wasserstoffperoxid in der Lage ist.

30 Die quantitative Bestimmung des gebildeten Wasserstoff-
peroxids wird durch quantitative Ermittlung des gebildeten
Chinoniminpigments vorgenommen. Dabei ergibt sich aufgrund
der quantitativen Bestimmung des gebildeten Wasserstoff-
peroxids im Reaktionssystem A gemäss dem 4-AA-Verfahren,
dass 4,92 μ Mol Wasserstoffperoxid aus 5 μ Mol Glycerin
gebildet worden sind.

(b) Bestätigung der Bildung von Glycerinaldehyd

35 (b)-1. Glycerinoxidase wird in Gegenwart von Sauerstoff
mit Glycerin umgesetzt. Als Reaktionsprodukt wird
Glycerinaldehyd identifiziert.

809844/0808

1 (b)-1-1. Nachweisverfahren

(b)-1-1-(1). Reaktionslösung

5 5 Tropfen einer wässrigen Lösung mit einem Gehalt
an 50 mg/ml Glycerin, 5 Tropfen einer Lösung mit
einem Gehalt an 10 u/ml Glycerinoxidase in 0,02 m
Tris-HCl-Puffer und 1 Tropfen mit 14 000 u/ml
Katalase werden vereinigt. Die Reaktion wird
10 20 Stunden unter Schütteln bei 30°C durchgeführt.

(b)-1-1-(2). Nachweis

15 Durch Dünnschichtchromatographie lässt sich als
Produkt in der Reaktionslösung Glycerinaldehyd
nachweisen, der mit einer authentischen Probe ver-
glichen wird.

20 Als Dünnschichtplatten werden Kieselgelplatten G-60F-254
(E. Merck, Darmstadt), verwendet. Als Laufmittel dient das
Lösungsmittelsystem 1 (Butanol:Essigsäure:Wasser = 4:1:1
(Volumteile)) und das Lösungsmittelsystem 2 (Butanol:Pyridin:
Wasser = 3:2:1,5 (Volumteile)).

25 Nach der Chromatographie werden drei verschiedene Reaktionen
auf der Platte durchgeführt: p-Anisidin-Salzsäure-Reaktion,
Perjodsäure-Benzidin-Reaktion und 2,4-Dinitrophenylhydrazin-
Reaktion. Die R_f -Werte der Reaktionsprodukte und die Färbungen
30 der einzelnen Flecken erweisen sich mit der authentischen
Probe als identisch. Die Ergebnisse sind in Tabelle II
zusammengestellt.

35

2817087

Tabelle II

Identifizierung der bei der Dünnschichtchromatographie erhaltenen Reaktionsprodukte
(R_f-Werte und Farbreaktionen)

Farbreagens	Laufmittel	Lösungsmittel-system 1	Lösungsmittel-system 2
	Probe		
p-Anisidin-Salzsäure-Reagens 1)	Glycerinaldehyd (authentische Probe)	R _f -Wert 0,67 (braun)	0,76 (braun)
	Reaktionsprodukt	R _f -Wert 0,67 (braun)	0,77 (braun)
Perjod-säure-Benzidin-Reagens 2)	Glycerinaldehyd (authentische Probe)	R _f -Wert 0,66 (+)*	0,76 (+)*
	Reaktionsprodukt	R _f -Wert 0,67 (+)*	0,77 (+)*
2,4-Dinitro-phenyl-hydrazin-Reagens 3)	Glycerinaldehyd (authentische Probe)	R _f -Wert 0,67 (orangefarben)	0,77 (orangefarben)
	Reaktionsprodukt	R _f -Wert 0,68 (orange-farben)	0,77 (orangefarben)

Die Farbangaben in Klammern beziehen sich auf die Färbung der Flecken. Unter (+)* beim Perjodsäure-Benzidin-Reagens ist ein weisser Flecken auf blauem Hintergrund zu verstehen.

Anmerkungen:

- 1) p-Anisidin-Reagens: Reduktive Carbonylverbindungen, wie Zucker, reagieren mit p-Anisidin-Salzsäure unter Bildung von für die jeweiligen Strukturen charakteristischen Färbungen.

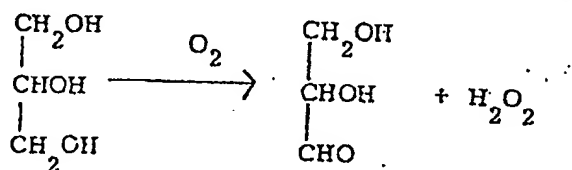
809844/0808

- 1 2) Perjodsäure-Benzidin-Reagens: Polyalkohole und Verbindungen
ähnlicher Struktur reagieren mit Perjodsäure. Somit lassen
sich diese Verbindungen als weisse Flecken nachweisen.
- 5 3) 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens: Carbonylverbindungen
reagieren mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin unter Bildung
von 2,4-Dinitrophenylhydrazon und lassen sich als orange-
farbene Flecken nachweisen.
- 10 Wie sich aus der vorstehenden Tabelle ergibt, verhalten sich
die authentischen Glycerinaldehyd-Proben in bezug auf die
 R_F -Werte und bei den Färbungsreaktionen vollkommen identisch
mit den eingesetzten Reaktionsprodukten. Dadurch wird bestätigt,
dass bei der Umsetzung von Glycerinoxidase mit Glycerin in
15 Gegenwart von Sauerstoff Glycerinaldehyd entsteht.
- (b)-2. Die bei der Umsetzung von Glycerinoxidase mit Glycerin
in Gegenwart von Sauerstoff gebildete Menge an Glycerin-
aldehyd ist fast äquimolar zur verbrauchten Glycerin-
20 menge. Dies wird durch Zusatz von 2,4-Dinitrophenyl-
hydrazin zum Reaktionssystem unter anschliessender
quantitativer, colorimetrischer Bestimmung des ge-
bildeten 2,4-Dinitrophenylhydrazons bestätigt.
- 25 (c) Bestimmung der Sauerstoffaufnahme
- Der Sauerstoffverbrauch des Systems bei Umsetzung von
Glycerin in Gegenwart von Glycerinoxidase wird mit einer
Sauerstoffelektrode und einem Warburg-Manometer gemessen.
Es ergibt sich, dass die Sauerstoffaufnahme der Menge des
30 gebildeten Glycerinaldehyds entspricht.
- (d) Eine quantitative Bestimmung der Menge an Wasserstoff-
peroxid und Glycerinaldehyd sowie der Sauerstoffaufnahme
wird gemäss den vorstehend unter (a), (b) und (c) ange-
35 gebenen Verfahren durchgeführt. Die erhaltenen Werte

2817087

sind im Hinblick auf ihre Stöchiometrie plausibel.

Die vorstehenden qualitativen und quantitativen Versuchsergebnisse bestätigen, dass durch das erfindungsgemässe Enzym Glycerin unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Glycerinaldehyd gemäss nachstehender Reaktionsgleichung oxidiert wird.



II. Substratspezifität

Die relative Aktivität wird unter Verwendung von anderen Substraten in äquimolaren Mengen zum Glycerin im Verfahren zur Messung der Aktivität gemäss dem 4-AA-Verfahren bestimmt.

Die relativen Aktivitäten gegenüber anderen Substraten sind in Tabelle III zusammengestellt, wobei die Aktivität gegenüber Glycerin gleich 100 gesetzt wird.

Tabelle III

Substrat	Enzym	Enzym der Gattung Aspergillus	Enzym der Gattung Neurospora
Glycerin		100	100
1,2-Propandiol		10,5	0
1,3-Propandiol		3,3	0
1,3-Butandiol		2,0	0
Glycerin-3-phosphorsäure		0,4	21
1,4-Butandiol		0,3	0
2,3-Butandiol		0,3	0
Ethanol		0	0
n-Propanol		0	0
Isopropanol		0	0

III. pH-Optimum und stabiler pH-Bereich

1. Das pH-Optimum des Enzyms der Gattung Aspergillus liegt im Bereich von 7 bis 8.

Die Aktivitäten werden nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt.

2. Der stabile pH-Bereich des Enzyms der Gattung Aspergillus liegt bei 5,0 bis 8,0.

Die Restaktivitäten werden nach 30-minütiger Behandlung bei 30°C und verschiedenen pH-Werten gemessen, wobei die nachstehend angegebenen Puffer verwendet werden. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 dargestellt.

2817087

pH-Wert 4 bis 5: Acetatpuffer
pH-Wert 6 bis 7: Tris-HCl-Puffer
pH-Wert 8 bis 9: Boratpuffer

3. Das pH-Optimum des Enzyms der Gattung Neurospora liegt bei 8,0 bis 8,5.

Die Aktivität wird nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C und bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 dargestellt.

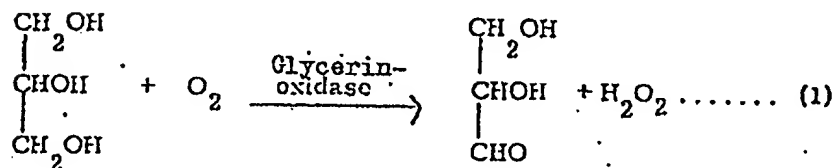
4. Der stabile pH-Bereich des Enzyms der Gattung Neurospora liegt bei 5 bis 8,0. Die Messung wird gemäss Abschnitt III-2 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 dargestellt.

IV. Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität

(a) Prinzip

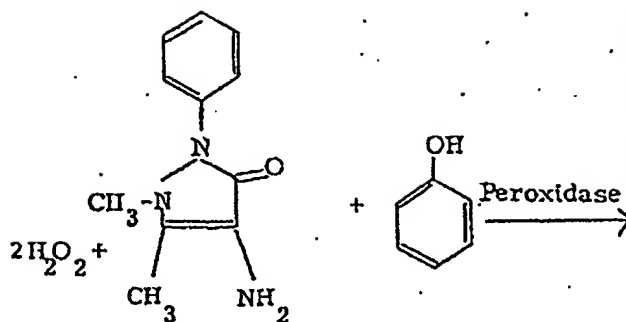
Die Bestimmung der Enzymaktivität wird durch Umsetzung des enzymatisch gebildeten Wasserstoffperoxids mit 4-Aminoantipyrin und Phenol in Gegenwart von Peroxidase durchgeführt. Dabei wird ein Chinoniminpigment erhalten, das quantitativ bestimmt wird.

Die nachstehenden Reaktionsgleichungen erläutern dieses Verfahren:

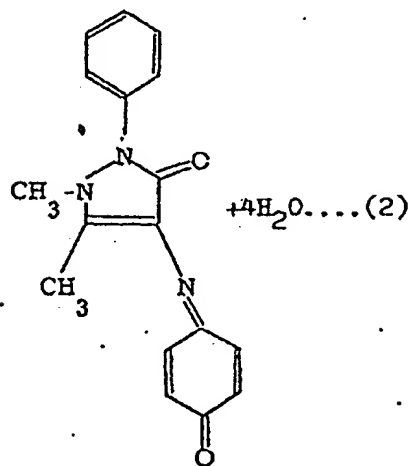


809844/0808

2817087



4-Aminoantipyrin:



Die Reaktionsgleichung (2) ergibt sich im Prinzip aus
 30 C.C. Allain und Mitarb., Clin. Chem., Bd. 20 (1974), S.470.

2817087

1 (b) Reagentien

- | | | |
|----|---|--------|
| | (1) Substrat: wässrige 0,1 m Glycerinlösung | 0,5 ml |
| 5 | (2) Puffer: 0,1 m Ammoniumpuffer vom pH-Wert 8 | 1,0 ml |
| | (3) 4-Aminoantipyridin: wässrige 2,4 millimolare Lösung | 0,5 ml |
| 10 | (4) Phenol: 42 millimolar (wässrige Lösung) | 0,5 ml |
| | (5) wässrige Peroxidaselösung (Proteinmenge 2 mg/ml, spezifische Aktivität 100) | 0,1 ml |
| 15 | (6) Wasser | 0,3 ml |
| | (7) wässrige Enzymlösung | 0,1 ml |

20 (c) Versuchsdurchführung

Die Reagentien (1) bis (6) werden in einem Reagenzglas vermischt und 5 Minuten bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die Enzymlösung zugesetzt. Das Gemisch wird sodann mit Ammoniumpuffer auf 3 ml aufgefüllt. Die Umsetzung wird 10 Minuten unter Schütteln bei 37°C durchgeführt. Sodann wird das gleiche Verfahren wiederholt, wobei zum Vergleich anstelle der Versuchslösung Wasser verwendet wird. Die optische Dichte der Reaktionslösung bei 500 nm wird gemessen und der Unterschied zur Kontrolllösung (ΔOD) bestimmt.

30 (d) Berechnung der Enzymaktivität

1 Einheit Glycerinoxidase ist die Enzymmenge, die 1 μ Mol Glycerin bei 37°C innerhalb 1 Minute zersetzt.

809844/0808

2817087

Der Absorptionskoeffizient von 0,5 millimolarem Chinon-
iminpigment wird zu 5,33 angegeben (vgl. Clin. Chem.,
Bd. 20 (1974), S. 470). Somit lässt sich die gewünschte
Enzymaktivität (A) pro 1 ml Enzymlösung nach folgender
Gleichung berechnen, wenn die optische Dichte (ΔOD)
bei 500 nm einer 3 ml Reaktionslösung gemäss IV-(c)
ermittelt ist:

$$A = \underline{a} \times \frac{1}{5,33} \times 3 \times \frac{1}{10}$$
$$= \underline{a} \times 0,56 \text{ (Einheiten/ml)}$$

Die Werte für die optische Dichte der Reaktionslösungen
bei 500 nm (die ein Mass für die Enzymaktivität dar-
stellen) werden in Abhängigkeit von der Reaktionszeit
ermittelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt.

Aus Fig. 6 ergibt sich, dass die optische Dichte bei 500
nm proportional zur Reaktionszeit ist.

V. Optimaler Temperaturbereich für die enzymatische Aktivität

1) Enzym der Gattung Aspergillus

Die enzymatischen Aktivitäten nach 10-minütiger In-
kubation bei pH-Wert 8 und verschiedenen Temperaturen
sind in Fig. 7 dargestellt. Das Temperaturoptimum
liegt bei etwa 40°C.

2) Enzym der Gattung Neurospora

Die enzymatischen Aktivitäten nach 10-minütiger In-
kubation bei pH-Wert 8 und verschiedenen Temperaturen
sind in Fig. 8 angegeben. Das Temperaturoptimum liegt
bei etwa 35 bis 45°C.

809844/0808

2817087

1 VI. Inaktivierung bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen

Einfluss des pH-Werts

Wie vorstehend unter III. in bezug auf das pH-Optimum
5 und den stabilen pH-Bereich erläutert, wird das Enzym
der Gattung *Aspergillus* bei pH-Werten unterhalb von 4
und oberhalb von 10 im wesentlichen zu 100 Prozent in-
aktiviert. In ähnlicher Weise wird das Enzym der Gattung
10 *Neurospora* bei pH-Werten unterhalb von 4 und oberhalb von
10 im wesentlichen zu 100 Prozent inaktiviert.

Einfluss der Temperatur

Die restliche Aktivität nach 30-minütiger Wärmebehandlung
in 0,1 m Tris-HCl-Puffer beim pH-Wert 7,0 wird gemessen.

15 In Fig. 9 sind die Ergebnisse für das Enzym der Gattung
Aspergillus und in Fig. 10 für das Enzym der Gattung
Neurospora angegeben. Das erstgenannte Enzym ist bei
Temperaturen bis zu 40°C zu 100 Prozent stabil, wird aber
20 bei 45°C zu etwa 60 Prozent inaktiviert. Das letztgenannte
Enzym wird bei 30°C zu etwa 50 Prozent und bei 50°C zu
etwa 100 Prozent inaktiviert. Das Enzym der Gattung
Aspergillus wird durch Zusatz von 0,1 millimolar Dithio-
threit stabilisiert. Die thermische Beständigkeit wird
25 dadurch ebenfalls gesteigert (vgl. Fig. 9, aus der sich
eine Stabilität bis etwa 50°C ergibt.

Die erfindungsgemässe Glycerinoxidase lässt sich für die
quantitative Bestimmung von Glycerin verwenden.

30 Folgende Verfahren zur quantitativen Glycerinbestimmung
sind erfindungsgemäss möglich:

(a) Umsetzung von Glycerinoxidase mit Glycerin in Gegenwart
von Sauerstoff und quantitative Bestimmung des gebildeten
35 Wasserstoffperoxids.

809844/0808

2817087

(b) Umsetzung des gemäss (a) gebildeten Glycerinaldehyds mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und quantitative, colorimetrische Bestimmung des erhaltenen 2,4-Dinitrophenylhydrazons, was eine quantitative Glycerinbestimmung ergibt.

(c) Umsetzung von Glycerinoxidase mit Glycerin in Gegenwart von Sauerstoff und Ermittlung der Sauerstoffaufnahme des Systems.

Die Prinzipien und die Verfahren der Bestimmungsmethoden (a), (b) und (c) sind im vorstehenden Abschnitt I erläutert. Nachstehend wird ein Beispiel für die Bestimmungsmethode (a) zur quantitativen Bestimmung von Glycerin unter Messung der Menge des gebildeten Wasserstoffperoxids näher erläutert:

Die optische Dichte von Reaktionslösungen bei 500 nm wird gemäss Abschnitt IV-(c) ermittelt, wobei Lösungen mit einem Gehalt an 0,1 mg Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 3,2 pro ml Lösung verwendet werden. Die Substratkonzentrationen (Glycerinkonzentrationen) der Lösungen gemäss IV-(b) betragen 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 5,0 und 10,0 millimolar. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV

	Substratkonzentration, millimolar					
	0,1	0,2	0,5	1,0	5,0	10,0
optische Dichte bei 500 nm.	0,060	0,121	0,303	0,605	3,002	5,998

809844/0808

2817087

1 Es lässt sich eine lineare Beziehung zwischen der
Substratkonzentration (Glycerinkonzentration) und der
optischen Dichte der Lösungen bei 500 nm feststellen.
5 Auf dieser Basis lässt sich die Glycerinkonzentration
einer unbekannten Probe ermitteln.

Somit kann die Glycerinkonzentration von Lösungen unter
Verwendung von Glycerinoxidase gemessen werden. Erfindungs-
gemäss wird also ein neues Verfahren und eine Testkombi-
10 nation zur quantitativen Bestimmung von Glycerin und
dessen Derivaten zur Verfügung gestellt.

Für ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung von Gly-
cerin bestand ein Bedürfnis, insbesondere auf dem Gebiet
15 der Biochemie. Zur quantitativen Bestimmung von Tri-
glyceriden sind verschiedene Verfahren bekannt, wobei die
Triglyceride in Serum unter Bildung von Glycerin und
Fettsäuren hydrolysiert werden und das Glycerin bestimmt
wird.

20 Zur quantitativen chemischen Bestimmung von Glycerin
stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, beispiels-
weise das Chromotropsäure-Verfahren, das Acetylaceton-
Verfahren, das Triazol-Verfahren, das Randrup-Verfahren
25 und das Fluoreszenzverfahren gemäss Mendelsohn. Diese
Verfahren haben aber alle den Nachteil, dass sie für
Glycerin nicht spezifisch sind.

Ein bekanntes enzymatisches Verfahren zur Glycerinbe-
30 stimmung verwendet Glycerokinase (E.C. 2.7.1.30). Jedoch
muss die Umsetzung zusammen mit Pyruvatkinase (E.C. 2.7.
1.40) und Lactatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.27) durchge-
führt werden. Diese Bestimmung ist somit sehr zeitauf-
wendig und für grössere Probenzahlen ungeeignet.

35

809844/0808

2817087

1 Erfindungsgemäss wurde festgestellt, dass die Glycerin-
oxidase Glycerin direkt unter stöchiometrischer Bildung
von Wasserstoffperoxid oxidiert. Das erhaltene Wasser-
stoffperoxid lässt sich leicht in ein gefärbtes System
5 überführen, so dass eine quantitative Bestimmung von
Glycerin und somit eine quantitative Bestimmung von Tri-
glyceriden sehr einfach und spezifisch aufgrund einer
colorimetrischen quantitativen Bestimmung durchgeführt
werden kann.

10 Die Beispiele erläutern die Erfindung.

B e i s p i e l 1

15 300 ml Anzuchtmedium mit einem Gehalt an 10 g/Liter
Glycerin, 10 g/Liter Malzextrakt und 5 g/Liter Hefeextrakt
(pH-Wert vor der Sterilisation 6,2) werden in einem 2 Liter
fassenden Erlenmeyerkolben mit *Aspergillus japonicus* KY-45
(ATCC 1042, NRRL 11102, FERM-P Nr. 3959) beimpft und 48
20 Stunden unter Schütteln bei 30°C gezüchtet. 900 ml (ent-
sprechend 3 Kolben) der erhaltenen Anzuchtkultur werden
auf 15 Liter des gleichen Mediums, das sich in einem 30
Liter fassenden Fermenter befindet, überimpft und unter
Belüftung (15 Liter/min) und unter Rühren (250 U/min) 40
Stunden bei 30°C gezüchtet. Nach der Züchtung wird die
25 erhaltene Kulturbrühe abgenutscht. Der Filterkuchen wird
mit Wasser gewaschen. Man erhält 150 g (Trockengewicht)
Mikroorganismenzellen.

30 Diese Mikroorganismenzellen werden in 5 Liter 10 millimo-
larem Ammoniumpuffer vom pH-Wert 8,0 suspendiert und in
einer Dyno-Mühle (Willy A. Bachofen, Schweiz) aufgebrochen.
Nach dem Aufbrechen wird die Suspension unter Verwendung
einer Gefrierzentrifuge 20 Minuten bei 20 000 g zentri-
fugiert. Man erhält 4,7 Liter Überstand mit einem Protein-
35 gehalt von 51 g und einer spezifischen Aktivität von 0,05

809844/0808

2817087

- 1 Einheiten/mg. Dieser Überstand wird mit Ammoniumsulfat
versetzt. Die bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 30
bis 70 Prozent ausgefällten Fraktionen werden gesammelt
und in 50 ml 10 millimolarem Ammoniumpuffer vom pH-Wert
5 8,0 gelöst. Die erhaltene Lösung wird gegen 10 Liter 10
millimolarem Ammoniumpuffer dialysiert, wobei ein Dialyse-
schlauch aus regenerierter Cellulose (Cellophan) ver-
wendet wird.
- 10 Die Dialyse wird 48 Stunden bei einer Gesamtmenge von 40
Liter Dialyselösung fortgesetzt, wobei jeweils nach 12
Stunden die Dialyselösung ausgetauscht wird. Die dialysierte
Enzymlösung wird über eine mit DEAE-Cellulose (Serva Co.)
gepackte Säule der Abmessungen 5,5 x 40 cm gegeben. Diese
15 Säule ist vorher mit 10 millimolarem Ammoniumpuffer vom
pH-Wert 8,0 äquilibriert worden. Das dabei adsorbierte
Enzym wird mit dem genannten Puffer gewaschen, um nicht
adsorbierte Proteinverunreinigungen auszuwaschen. Zur
Elution wird ein linearer 0,1 bis 0,2 m Ammoniumsulfat-
20 gradient in 2 Liter 10 millimolarem Ammoniumpuffer vom
pH-Wert 8,0 verwendet. Dabei wird die Glycerinoxidase
eluiert. 500 ml aktive Fraktionen mit einem Proteingehalt
von 1,2 g und einer spezifischen Aktivität von 1,1, werden
gewonnen. Dieses Produkt wird bis zu einer Sättigung von
25 70 Prozent mit Ammoniumsulfat versetzt. Bei dem gebildeten
Niederschlag handelt es sich um das gewünschte Enzym.

Der Niederschlag wird durch 20-minütige Zentrifugation bei
20 000 g gesammelt und in 50 ml 10 millimolarem Ammonium-
30 puffer vom pH-Wert 8,0 gelöst. Die Lösung wird über eine
mit dreidimensional vernetztem, zur Gelchromatographie
geeigneten Dextran (Sephadex G-100) gepackte Säule der
Abmessungen 5,5 x 80 cm gegeben. Die Säule ist vorher
mit 10 millimolarem Ammoniumpuffer vom pH-Wert 8,0 äquili-
35 briert worden. 1 Liter 10 millimolarer Ammoniumpuffer vom

809844/0808

2817087

1 pH-Wert 8,0 werden zur Elution über die Säule gegeben.
Man erhält eine 300 ml-Fraktion von hoher spezifischer
Aktivität (Proteingehalt 310 mg, spezifische Aktivität
3,2). Diese Fraktion wird bis zu einer Sättigung von 70
5 Prozent mit Ammoniumsulfat versetzt. Das ausgefällte
Enzym wird durch 20-minütige Zentrifugation bei 20 000 g
gewonnen und sodann in 20 ml 10 millimolarem Ammonium-
puffer vom pH-Wert 8,0 gelöst. Die erhaltene Lösung wird
10 24 Stunden gegen 5 Liter 10 millimolarem Ammoniumpuffer
vom pH-Wert 8,0 dialysiert, wobei ein Dialyseschlauch aus
regenerierter Cellulose (Cellophan) verwendet wird und
die Dialyselösung 2 mal ausgetauscht wird. Die nach der
Dialyse erhaltene Enzymlösung wird über eine mit Hydroxyl-
apatit gepackte Säule der Abmessungen 5,5 x 20 cm gegeben,
15 die vorher mit 10 millimolarem Ammoniumpuffer vom pH-Wert
8,0 äquilibriert worden ist. Ferner werden 250 ml dieser
Pufferlösung über die Säule gegeben. Das Eluat wird
fraktioniert. Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität
von mehr als 20 werden gesammelt und gefriergetrocknet.
20 Man erhält 10,2 mg gereinigtes, pulverförmiges Enzymprä-
parat. Es handelt sich um Glycerinoxidase mit einer spezifi-
schen Aktivität von 30,2. Die spezifische Aktivität des
gereinigten Enzyms ist 610 mal grösser als die des Zell-
extrakts. Die Ausbeute beträgt 19 Prozent, bezogen auf
25 die Aktivität.

B e i s p i e l 2

Anstelle des in Beispiel 1 verwendeten Mikroorganismus
Aspergillus japonicus KY-45 wird Neurospora crassa KY-462
30 (NRRL 11106, FERM-P Nr. 3960) auf 2 Liter fassende Erlen-
meyerkolben überimpft, die 10 g/Liter Glycerin, 10 g/Liter
Malzextrakt und 5 g/Liter Hefeextrakt enthalten.
Die Züchtung wird gemäss Beispiel 1 unter Schütteln 48
Stunden bei 30°C durchgeführt.

809844/0808

2817087

1 Die erhaltene Kulturbrühe wird gemäss Beispiel 1 extrahiert
und gereinigt. Man erhält 1,1 mg gereinigtes Enzymprä-
parat. Es handelt sich um Glycerinoxidase mit einer spezi-
fischen Aktivität von 14,1. Bezogen auf die Aktivität
5 beträgt die Ausbeute 10,5 Prozent.

Beispiel 3

Die in Tabelle V angegebenen Mikroorganismenstämme werden
im Verfahren von Beispiel 1 anstelle von Aspergillus
10 japonicus KY-45 verwendet. Die Aktivitäten der erhaltenen
Überstände der Zellextrakte sind ebenfalls in Tabelle V
angegeben.

Tabelle V

15	<u>Stämme</u>	<u>Aktivität (u/Liter)</u>
	Aspergillus oryzae KY-63 (NRRL 11103)	32,0
	Aspergillus parasiticus KY-77 (NRRL 11104)	21,6
20	Aspergillus flavus KY-98 (NRRL 11105)	10,8
	Neurospora sitophila KY-445 (NRRL 11264)	32,5
	Neurospora tetrasperma KY-447 (NRRL 11265)	10,5

Beispiel 4

25 (a) Reagentien

- (1) Zu untersuchende Lösung: Wässrige
Glycerinlösung von unbekannter
Konzentration 0,5 ml
- 30 (2) Puffer: 0,1 M Ammoniumpuffer vom
pH-Wert 8 1,0 ml
- (3) 2,4 millimolare wässrige 4-Amino-
antipyrinlösung 0,5 ml
- (4) 42 millimolare Phenollösung 0,5 ml
- 35 (5) wässrige Peroxidaselösung mit
einem Proteingehalt von 20 mg/ml und
einer spezifischen Aktivität von 1000 0,1 ml

809844/0808

2817087

- 1 (6) Wasser 0,3 ml
(7) Glycerinoxidase gemäss Beispiel 1
mit einem Proteingehalt von 1,0 mg/ml
und einer spezifischen Aktivität
5 von 3,2 0,1 ml

(b) Verfahren

Die Reagentien (1) bis (6) werden in ein Reagenzglas
gegeben und 5 Minuten bei 37°C ausreichend geschüttelt.
10 Anschliessend wird die Enzymlösung zugesetzt.
Das erhaltene Reaktionsgemisch wird mit Ammonium-
puffer auf 3 ml aufgefüllt. Die Reaktion wird 10
Minuten unter Schütteln bei 37°C durchgeführt.

15 Zum Vergleich wird das gleiche Verfahren unter Ver-
wendung von Wasser anstelle einer Glycerinlösung durch-
geführt.

Die optische Dichte der zu untersuchenden Lösung bei
20 500 nm wird gemessen. Die Differenz der optischen
Dichte zur Vergleichsprobe beträgt 0,230. Aus der
Kurve von Fig. 11 lässt sich ein Glyceringehalt der
zu bestimmenden Lösung von 0,380 millimolar ermitteln.

25

30

35

-34-

2817087

FIG. 3

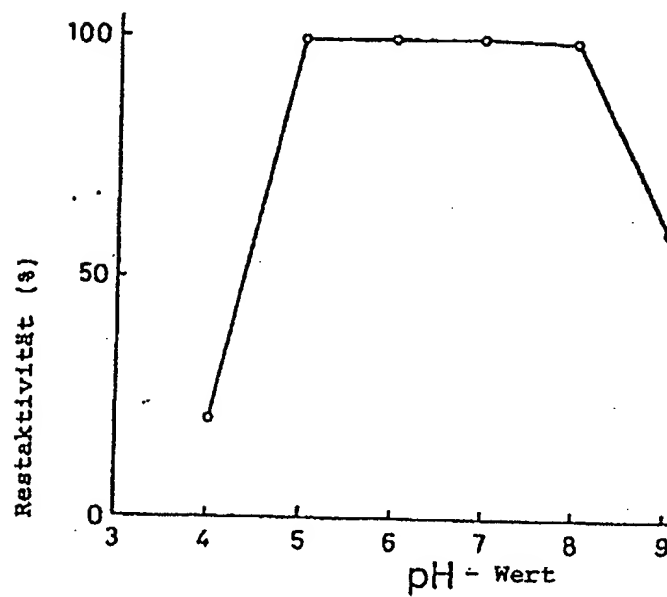
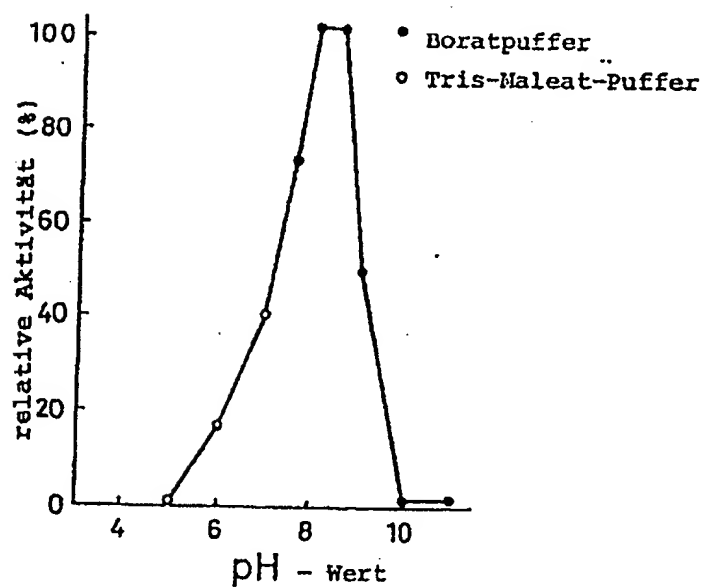


FIG. 4



809844/0808

FIG. 5

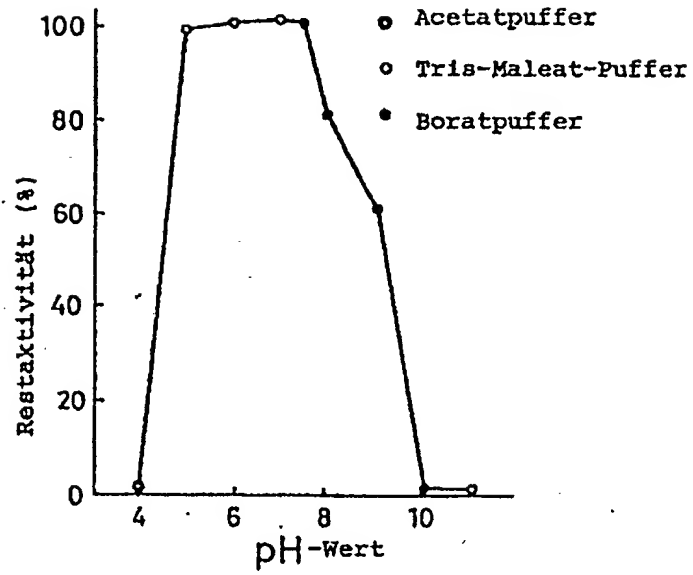
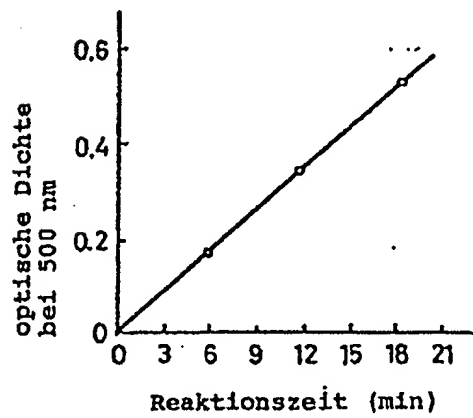


FIG. 6



- 36 -

FIG. 7

2817087

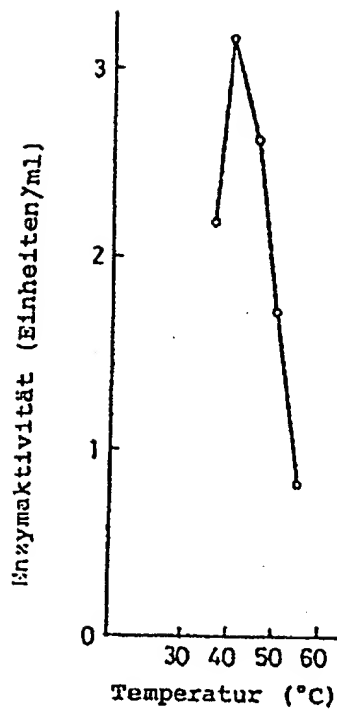
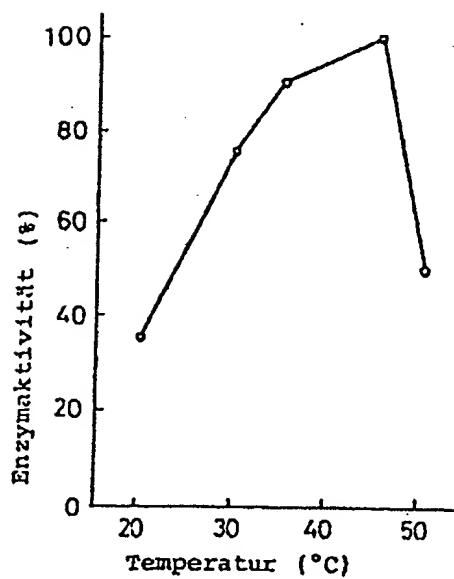


FIG. 8



809844/0808

FIG. 9

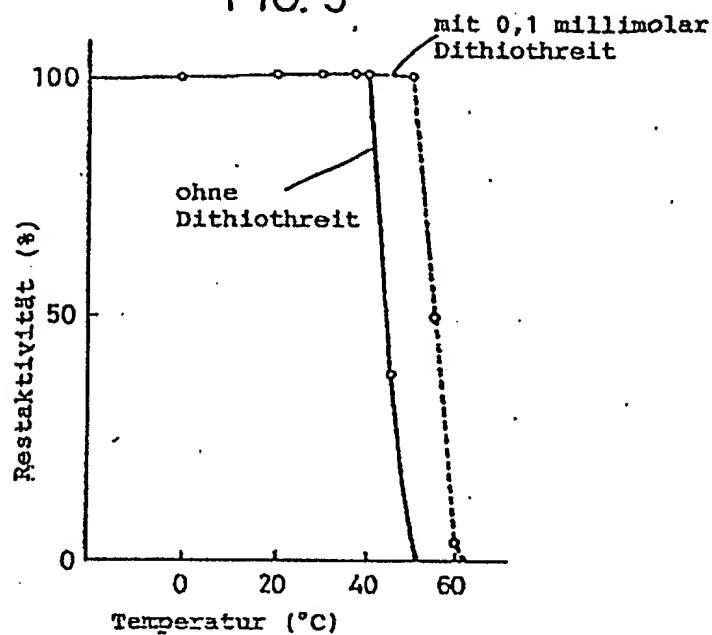


FIG. 10

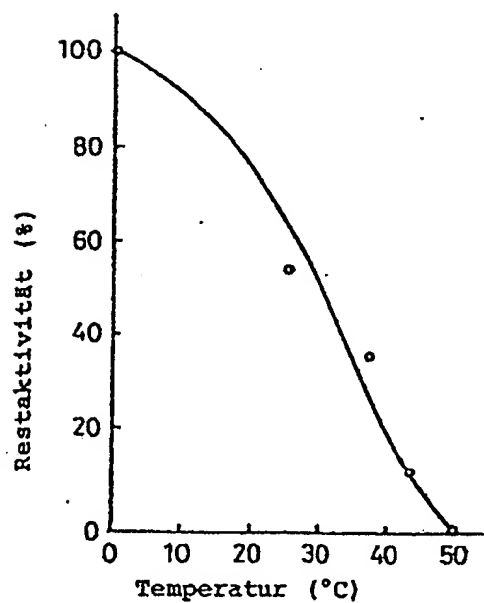
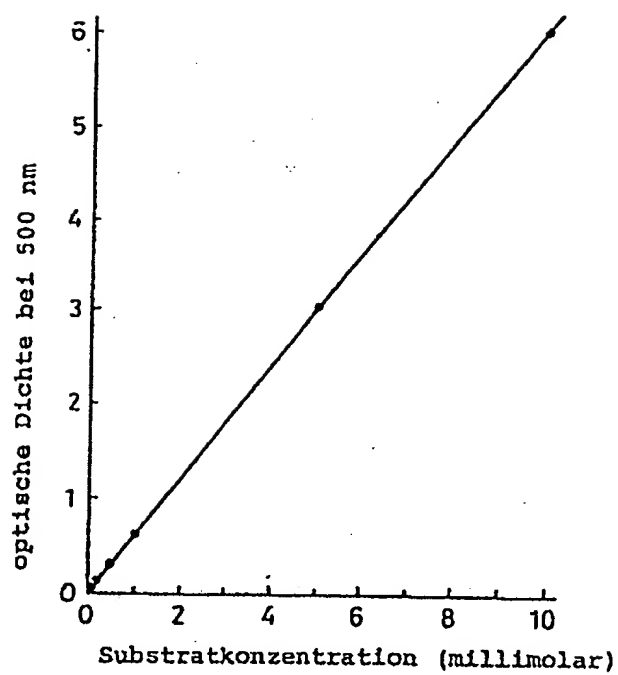


FIG. 11



39.-
2817087

Nummer: 28 17 087
Int. Cl.²: C 12 D 13/10
Anmeldetag: 19. April 1978
Offenlegungstag: 2. November 1978

FIG. 1

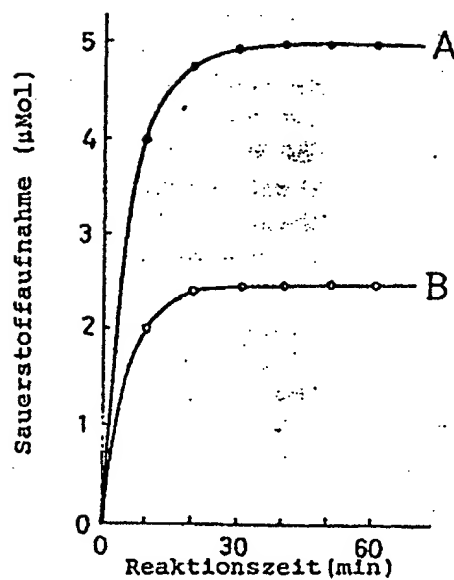
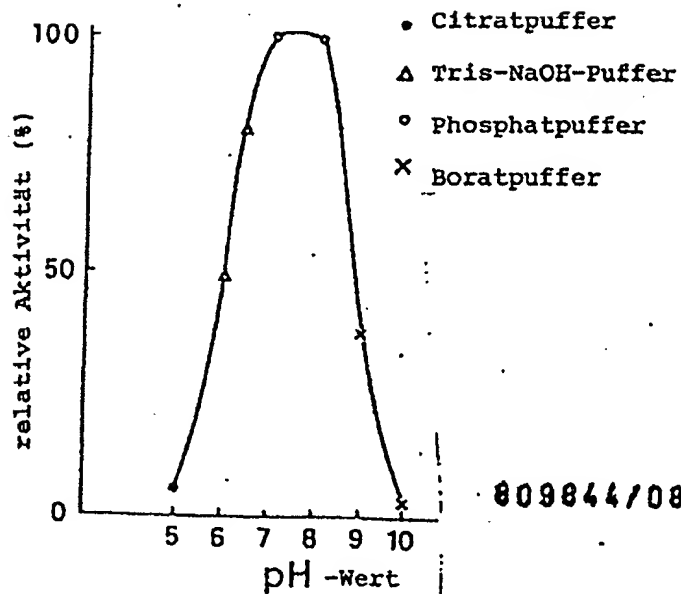


FIG. 2



809844/0808

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.